

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Marina Marinčić
6284/PT

ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA
U KOMINI GROŽĐA SORTE MERLOT
ZAVRŠNI RAD

Modul: Začinsko i aromatsko bilje

Mentor: prof. dr. sc. Branka Levaj

Zagreb, 2015.

Ovo istraživanje financirano je sredstvima projekta "Primjena inovativnih tehnologija u izolaciji bioaktivnih spojeva iz organskog otpada u proizvodnji vina". Projekt je sufinancirala Europska unija u okviru poziva RC.2.2.08 „Jačanje kapaciteta za istraživanje, razvoj i inovacije“ financiranog iz Europskog fonda za regionalni razvoj, Operativni program Regionalna konkurentnost 2007. -2013.

DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu

Prehrambeno-biotehnološki fakultet

Preddiplomski studij: Prehrambena tehnologija

Zavod za prehrambeno-tehnološko inženjerstvo

Laboratorij za procese konzerviranja i preradu voća i povrća

ODREĐIVANJE UKUPNIH FENOLA I ANTOCIJANA U TROPU GROŽĐA SORTE MERLOT

Marina Marinčić, 6284/PT

Sažetak: Cilj ovog istraživanja je bio ispitati utjecaj vremena (30, 45 i 60 min) i upotrebe 50% vodene otopine etanola, te iste otopine s udjelom 0,5 i 1% klorovodične kiseline, na izolaciju fenola i antocijana iz pokožice grožđa sorte Merlot primjenom ekstrakcije pomoću refluksa. Određivanje ukupnih fenola i antocijana provedeno je spektrofotometrijski. Najviši prinos ukupnih fenola određen je u ekstraktu ekstrahiranom 60 min uz dodatak 0,5% klorovodične kiseline. Najviši prinos antocijana određen je u ekstraktu ekstrahiranom 30 min uz dodatak 0,5% klorovodične kiseline.

Ključne riječi: fenoli, antocijani, ekstrakcija, grožđe, komina

Rad sadrži: 31 stranica, 3 slike, 3 tablice, 28 literaturnih navoda

Jezik izvornika: hrvatski jezik

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u: Knjižnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Branka Levaj

Pomoć pri izradi: dr. sc. Danijela Bursać-Kovačević, *viši asistent*

Rad predan: rujan, 2015.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Final work

University of Zagreb

Faculty of Food Technology and Biotechnology

Undergraduate studies Food Technology

Department of food technology engineering

Laboratory for technology of fruit and vegetables preservation and processing

POLYPHENOLS AND ANTHOCYANINS OF GRAPE POMACE FROM CV. MERLOT

Marina Marinčić, 6284/PT

Abstract: The aim of this study was to examine the effect of time (30, 45 and 60 minute) and the use of 50% aqueous ethanol, and the same solution with a share of 0.5 and 1% hydrochloric acid, on the isolation of polyphenols and anthocyanins from the skin of the Merlot variety grapes. The proces of determination of total polyphenols and anthocyanins was carried out by spectrophotometry.

The highest yield of total polyphenols in the extract was determined by the 60 minute extraction with the addition of 0,5 % hydrochloric acid. The highest yield of anthocyanins in the extract was determined by the 30 minute extraction with the addition of 0,5 % hydrochloric acid.

Keywords: polyphenols, anthocyanins, extraction, grapes, grape pomace

Thesis contains: 31 pages, 3 figures, 3 tables, 28 references

Original in: Croatian

Final work in printed and electronic (pdf format) version is deposited in: Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, Kačićeva 23, Zagreb

Mentor: *PhD. Branka Levaj, Full Professor*

Technical support and assistance: *PhD. Danijela Bursać Kovačević, Scientific Assistant*

Thesis delivered: September, 2015.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. Značaj vinove loze	2
2.1.1. Merlot	2
2.1.2. Mehanički sastav grožđa	3
2.2. Kemijski sastav komine.....	4
2.3. Fenolni spojevi.....	4
2.3.1 Flavonoidi	5
2.3.2. Antocijani.....	6
2.3.3. Fenolni spojevi u komini	7
2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva	8
2.4.1. Utjecaj otapala na proces ekstrakcije	9
2.4.2. Utjecaj vremena i temperature na proces ekstrakcije	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	11
3.1. MATERIJAL.....	11
3.2.METODE RADA	11
3.2.1. Priprema ekstrakta	11
3.2.2. Određivanje ukupnih fenola	13
3.2.3. Određivanje antocijana	15
4. REZULTATI	17
5. RASPRAVA	19
5.1. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva.....	19
5.2. Utjecaj trajanja postupka obrade na ekstrakciju fenolnih spojeva	19
5.3. Utjecaj vrste otapala i vremena trajanja na ekstrakciju fenolnih spojeva	20
5.4. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju antocijana	20
5.5. Utjecaj trajanja postupka obrade na ekstrakciju antocijana.....	21
5.6. Utjecaj vrste otapala i trajanja postupka obrade na ekstrakciju antocijana	21
5.7. Utjecaj vrste otapala i trajanja postupka obrade na ekstrakciju ukupnih fenola i antocijana...	21
6. ZAKLJUČAK.....	22
7. LITERATURA	23

1. UVOD

Vinova loza (*lat. Vitis vinifera*) biljka je iz porodice *Vitaceae*. Plod vinove loze je grožđe koje se uglavnom prerađuje u vino. Tijekom proizvodnje vina zaostaje značajna količina nusproizvoda (oko 20 %) koja se sastoji od peteljke, pokožice i sjemenke. Nusproizvode je potrebno adekvatno zbrinjavati kako ne bi došlo do nepovoljnog utjecaja na okoliš. Također, nusproizvod od proizvodnje vina ima veliki biološki potencijal jer sadrži velik udio fenolnih spojeva, lignin, minerale, vitamine, itd. Jedan od najvrijednijih sastojaka nusproizvoda od proizvodnje vina su upravo fenolni spojevi zbog toga što imaju antioksidacijsko, antimikrobno, protuupalno i brojna druga pozitivna djelovanja te se smatra da kontinuirani unos antocijana i drugih polifenola smanjuje rizik obolijevanja od kroničnih bolesti.

Pri izolaciji fenolnih spojeva iz prirodnog supstrata, ekstrakciju je važno provesti pri optimalnim uvjetima, a provodi se uz primjenu različitih tehnika, od klasične preko ekstrakcije potpomognute mikrovalovima, ultrazvukom, visokim hidrostatskim tlakom (VHT) i sl. U ovom radu provedena je klasična ekstrakcija.

Cilj ovog rada je odrediti količinu ukupnih fenola i antocijana u ekstraktu pokožice grožđa sorte Merlot te utvrditi kojim otapalom (EtOH, EtOH+0,5% HCl, EtOH + 1% HCl) i u kojem vremenskom intervalu (30, 45 i 60 min) se postiže najbolja ekstrakcija. Ukupni fenoli određeni su spektrofotometrijski primjenom Folin-Ciocalteu metode, a antocijani su određeni spektrofotometrijski pH diferencijalnom metodom.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Značaj vinove loze

Vinova loza (*lat. Vitis vinifera*) biljka je iz porodice *Vitaceae*. To je najraširenija voćna vrsta u svijetu čija je godišnja proizvodnja u 2013. godini dosegla 77 milijuna tona (FAOSTAT, 2015). Zemlja s najvećom proizvodnjom grožđa je Kina. Za proizvodnju vina koristi se 80% usjeva vinove loze, 13% otpada na konzumaciju u svježem obliku, dok se preostalih 7% grožđa prerađuje u voćne sokove ili suhe grožđice (El Gengaihi i sur., 2013; Shahidi i Naczk, 2004).

Zahvaljujući reljefu, klimi i tlu te nekim drugim čimbenicima, u Hrvatskoj je moguće uzgajati više kvalitetnih sorti vinove loze od koji se mogu proizvesti vrhunska vina. U svijetu vinogradarstva poznaju pet zona uzgoja, koje se kategoriziraju po broju sunčanih sati i temperaturi, što su glavne pretpostavke uzgoja kvalitetnih sorti. Hrvatska je jedna od rijetkih zemalja koja ima svih pet zona. Ona najsunčanija, pa samim tim i najpovoljnija, započinje južno od Splita, a završava južno od Dubrovnika, u Konavlima, uključujući i srednjodalmatinske otoke.

Prema izvješću Hrvatskog zavoda za vinogradarstvo i vinarstvo (2008.) deset najzastupljenijih sorata vinove loze u vinogradarskom sortimentu Republike Hrvatske čine graševina, malvazija istarska bijela, plavac mali crni, trbljan bijeli, plavina, merlot crni, rizling rajnski, kujundžuša i babiće crni.

2.1.1. Merlot

Merlot je sorta grožđa koja je po raširenosti sadnje vinove loze druga u svijetu. Potječe iz Francuske ali raširen je u većini značajnih zemalja koje se bave proizvodnjom vina kao što su Argentina, Čile, Austrija, itd. (Anonymus 1)

Kod nas je svrstana među preporučene kultivare samo u četiri podregije kontinentalne Hrvatske (Podunavlje, Slavonija, Prigorje-Bilogora i Pokuplje) i u svim podregijama regije Primorska Hrvatska. (Anonymus 2)

Bujnost trsa je srednja. Rozgva je srednje debela, dugačkih internodija, smeđecrvenkaste boje. List je velik, trodijelan ili peterodijelan. Sinusi su otvoreni. Sinus od peteljke je u obliku slova „U“. Cvijet je hermafroditan.

Grozđ je srednje krupan ili sitan, konusnog ili cilindrično-konusnog oblika, često sa jednim krilcem. Masa grozda varira u širokim granicama od 40 do 150 grama. Bobice su okrugle, tamnoplave boje. Meso je dosta čvrsto, bezbojno.



Slika 1. Grozđ sorte Merlot (Anonymus 3)

2.1.2. Mehanički sastav grožđa

Količinski odnos dijelova grožđa u postocima iznosi peteljka 3-7 %, bobica 94-97 %. Od ukupne težine bobice na kožicu otpada 7-18% u kojoj se nalazi značajna količina fenolnih spojeva, a ponajviše antocijana i fenolnih kiselina.

Na površini pokožice nalazi se voštani sloj, tzv. mašak. Mašak na kožici sadrži mikrofloru bobice (kvasci i bakterije). Značaj pokožice je u njenom kemijskom sastavu koji ima veliki utjecaj na okus vina. Kemijski sastav pokožice: šećer 1-3%, kiseline 3-7%, tanin 0,3-2,5 %, pepeo 0,3-3% i dušične tvari 1,5-5,2% (Milorad Zoričić, Kultura vina, 2009.).

Sadržaj šećera u moštu Merlota kreće se od 18 do 22%. Vino sadrži od 11 do 13 vol. % alkohola s 5,5 do 7,5 g/l ukupne kiseline, ukupnog ekstrakta: 23-28 g, glicerola: 6,7-10 g/l, pepela: 1,8-2,9 g/l. (Milorad Zoričić, Kultura vina, 2009.)

2.2. Kemijski sastav komine

Prilikom prerade grožđa za proizvodnju vina, procesom ruljanja i muljanja dobiva se groždani masulj, zgnječeno grožđe u krutoj (pokožica, sjemenka i peteljka) i tekućoj fazi (groždani sok). Prešanjem masulja dobiva se komina koja čini 20% težine ukupnog prerađenog grožđa (El Gengaihi i sur., 2013; Rajha i sur., 2013). Pri proizvodnji crnog vina prije prešanja provodi se proces maceracije i fermentacije.

Kemijski sastav komine ovisi o sorti grožđa, stupnju zrelosti, stanju biljke te klimatskim uvjetima. Također, značajne razlike u kemijskom sastavu prisutne su i ovisno o dijelu bobice grožđa, pa tako i između sjemenke i pokožice grožđa.

Komina je bogata fenolonim spojevima i predstavlja visokovrijednu sirovinu za ekstrakciju biološki aktivnih spojeva (Ignat i sur., 2011; Kammerer i Carle, 2008; Rajha i sur., 2013). Tijekom procesa proizvodnje vina, dulji proces maceracije, odnosno dulji kontakt mošta s kominom tijekom fermentacije omogućuje prijelaz veće količine fenolnih spojeva u mošt. Međutim, neki fenolni spojevi ostaju vezani za staničnu stijenku i ne ekstrahiraju se tijekom maceracije te stoga zaostaju u komini (Shahidi i Nacz, 2004).

Najzastupljenije fenolne komponente komine su antocijani, flavonoli i njihovi glikozidi, katehin i fenolne kiseline. Od nefenolnih spojeva najzastupljeniji su lupeol, oleinska kiselina i β -sitosterol (Corrales i sur., 2009).

2.3. Fenolni spojevi

Fenolni spojevi su skupina sekundarnih metabolita koji su jedni od najbrojnijih spojeva u biljnom svijetu. Prema strukturi spojeva dijele se na fenolne kiseline, flavonoide i neflavonoide (stilbeni) (Balasundram i sur., 2006.). Fenolni spojevi su u biljnoj hrani važni zbog njihovog antioksidacijskog djelovanja vezanog uz sposobnost hvatanja slobodnih radikala te općenito pozitivnih učinaka na ljudsko zdravlje.

Heterogena su skupina spojeva, ali gledano s kemijskog stajališta osnovno obilježje im je prisutnost jednog ili više hidroksilnih benzenskih prstena. Većina prirodnih fenolnih spojeva prisutna je u obliku konjugata s mono- i polisaharidima, vezanim za jednu ili više fenolnih skupina, a mogu se pojavljivati i kao esteri (Balasundram i sur.,2006.).

Na sastav i količinu fenolnih spojeva u biljkama imaju utjecaja uvjeti u okolišu: svjetlost, temperatura, agrotehničke mjere te uvjeti skladištenja i obrade. Količine nekih fenola se mogu povećati u uvjetima stresa, povećanog UV zračenja, patogenih stanja, oštećenja, zagađenja zraka i u ekstremnim uvjetima (Zobel, 1997.).

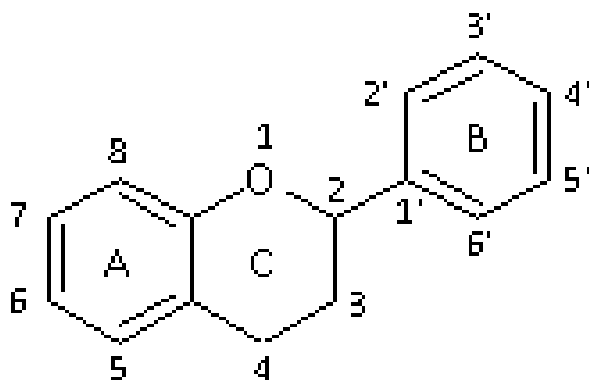
Fenolni sastav biljnih materijala predmet je mnogobrojnih studija pa tako i analize grožđa. Najviše fenolnih spojeva u grožđu se nalazi u sjemenkama i pokožici bobice, a najbrojniji su proantocijanidini i antocijani.

Antocijani se u grožđu najčešće nalaze kao monoglukozidi pet antocijanida: malvidina, delfinidina, cijanidaina, petunidina i peonidina; te manjih udjela njihovih derivata: acetatnih, kafeinskih i p-kumarinskih estera. Zadnjih nekoliko godina antocijani privlače veliku pažnju jer imaju važnu ulogu u senzorskim svojstvima i nutritivnim vrijednostima bobice grožđa i vina (Zhu i sur.,2012.), ali i zbog pozitivnog utjecaja u borbi protiv kardiovaskularnih bolesti.

2.3.1 Flavonoidi

Flavonoidi su skupina polifenolnih spojeva koji se nalaze u mnogim biljkama, koncentrirani u sjemenkama, pokožici ili kori voća, kori drveća, lišću i cvijeću. Velik broj ljekovitih biljaka sadrži flavonoide koji imaju izraženu antioksidacijsku i antiradikalnu aktivnost (Rice-Evans i sur.,1997). Zato se flavonoidima pripisuju i mnoga terapijska djelovanja, npr. antibakterijsko, protuupalno, antialergijsko, antimutageno, antiviralno i antikancerogeno, a znatno utječu na boju i okus hrane. Do danas je identificirano više od 6400 flavonoida.

Kao osnovnu kemijsku strukturu flavonoidi imaju difenolpropanski kostur (C6-C3-C6) (Balasundrum i sur.,2006.). Sastoji se od dva fenolna prstena (A i B) koji su povezani preko centralnog piranskog prstena (C) kao što je prikazano na slici (Jackson, 2008.).



Slika 2. Osnovna kemijska struktura flavonoida (Jackson, 2008.)

Prisutni su u obliku glikozida te se najčešće vežu s glukozom i ramnozom, a mogu i galaktozom, arabinozom i ksilozom. Mogu postojati kao slobodni ili kao polimeri vezani s drugim flavonoidima, šećerima, neflavonoidima ili njihovim kombinacijama (Jackson, 2008.).

Na osnovu njihove molekulske strukture mogu se podijeliti na nekoliko skupina: antocijani, flavonoli, flavanoni, flavanoli, izoflavoni i dr.

2.3.2. Antocijani

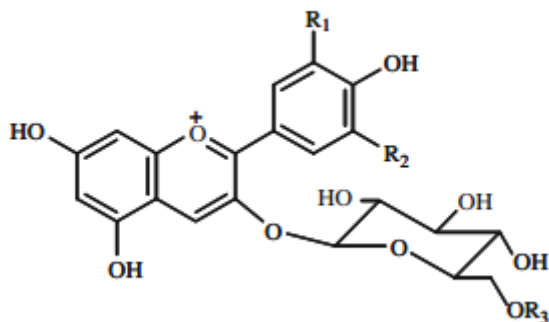
Antocijani pripadaju najvećoj skupini fenolnih spojeva, flavonoidima (Balasundram i sur., 2006.). U prirodi su najveća i najvažnija skupina pigmenata topljivih u vodi s preko 600 različitih spojeva (Clifford, 2000.). Antocijani (od grčkog *anthos*=cvijet i *kianos*=plava) su pigmenti odgovorni za nijanse narančaste, ružičaste, ljubičaste i plave boje u cvijeću i plodovima nekih biljaka. Glavni su sastojci crvenih, plavih i ljubičastih pigmenata u većine cvjetnih latica, voća i povrća (Anderson, 2006.).

Antocijani su biljni pigmenti koji se mogu ekstrahirati iz biljnog materijala i koristiti kao boje. Iako imaju veliki potencijal primjene u kozmetičkoj i farmaceutskoj industriji, njihova uloga je ograničena zbog njihove nestabilnosti i niskog postotka separacije. Drugo značajno svojstvo antocijana je njihova antioksidacijska aktivnost koja ima važnu ulogu u prevenciji kardiovaskularnih bolesti, dijabetesa i raka.

Temeljnu strukturu antocijana čini 2-benzil-1-benzopirilium kation (flavilium ion) čiji su položaji 3,5,7,4' hidroksilirani. Kemijska struktura im varira ovisno o stupnju hidroksilacije i metilacije B prstena te o glikolizaciji s različitim šećerima (Tsao, 2009.).

Glavne razlike između antocijana su broj hidroksilnih skupina, broj šećera vezanih na njihovu strukturu, alifatskih ili aromatskih karboksila vezanih na šećer u molekuli te položaj tih veza (Kong i sur.,2003.)

Također se razlikuju po broju i poziciji hidroksi i metoksi skupina u B-prstenu molekule.



Slika 3. Kemijska struktura antocijana

U biljkama se uglavnom nalaze u glikoziliranom obliku kojeg čini antocijanidin (aglikon) i šećer (Anderson, 2006.). Ako se glikonska jedinica antocijana hidrolizira, aglikon, odnosno nešećerni produkt hidrolize, naziva se antocijanidin (Balasundram i sur.,2006.).

U antocijanima najčešće se nalazi glukoza koja se može vezati na C-3 ili C-5 položaj molekule antocijanidina i na taj način povećati kemijsku stabilnost i topljivost antocijana. Osim toga, glukozni dio može biti esterificiran kiselinama (p-kumarinskom, kafeinskom kiselinom i drugima) obično na C-6 položaju što utječe na svojstva antocijana kao što su otpornost na svjetlost, toplinu, visoki pH, poboljšanje kakvoće i stabilnosti boje (Jackson, 2008.).

Različite boje potječu od $-H$, $-OH$ i $-OCH_3$ skupina. Plavo obojenje je intenzivnije što ima više $-OH$ skupina, a ljubičasto što je više $-OCH_3$ skupina (Balasundram, 2006.).

2.3.3. Fenolni spojevi u komini

U uzorcima komine antocijani predstavljaju najzastupljeniju skupinu fenola. Količine antocijana u komini crnih sorta grožđa kreću se od 287 do 4527 mg u 100 g metanolnog ekstrakta, dok su vrijednosti za flavonole od 104 do 464 mg u 100 g istog ekstrakta. Katehin se u sjemenkama različitih sorti grožđa nalazi u udjelima od 24,12 do 117 mg na 100 g suhog

ekstrakta, dok najviša zabilježena vrijednost za epikatehin iznosi 47,50 mg (Rockenbach i sur., 2011; Ruberto i sur., 2007).

2.4. Ekstrakcija fenolnih spojeva

Ekstrakcija je prvi i ujedno vrlo važan korak izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala, a za svaku biljnu vrstu potrebno je optimirati uvjete ekstrakcije. Metode ekstrakcije fenolnih spojeva proizlaze iz njihove strukture i oblika u kojem se nalaze u prirodnom supstratu. Fenolni spojevi se mogu ekstrahirati iz materijala koji može biti u svježem, suhom ili zamrznutom stanju, usitnjeni ili cijeli, ali najčešće u stanju u kojem se koristi za upotrebu. Odabirom prikladne metode ekstrakcije fenolnih spojeva treba voditi računa o topljivosti spojeva koje želimo ekstrahirati te odabrati pogodno otapalo.

Ekstrakcija otapalima i ekstrakcija super kritičnim plinovima su najčešće upotrebljavane tehnike izolacije fenolnih spojeva (Ignat i sur., 2011), a sve češće se koriste metode kao što su ekstrakcija superkritičnim tekućinama, ekstrakcija potpomognuta ultrazvukom, ekstrakcija potpomognuta visokim hidrostatskim tlakom, mikrovalovima, ubrzana ekstrakcija otapalima i kao jedna od najnovijih metoda, ekstrakcija pomoću hladne plazme (Teixeira i sur., 2013). Brojne su prednosti ovih metoda poput brzine, selektivnosti, ekološke prihvatljivosti, upotrebe manjih količina otapala, većeg prinosa od klasične ekstrakcije, i najvažnije, ove metode omogućuju kontrolu temperature prilikom ekstrakcije (Bhattacharya, 2015.).

Klasičnom ili konvencionalnom ekstrakcijom smatra se ekstrakcija pomoću refluksa. Ekstrakcija pod refluksom se izvodi tako da se biljni materijal uranja u otapalo u tikvici s okruglim dnom koja je spojena na povratno hladilo. Otapalo se zagrijava do vrenja, a kako se otapalo kondenzira, tako se reciklira u tikvicu (Rostagno i Prado, 2013).

Klasična ekstrakcija je najčešće korištena tehnika za izdvajanje fenolnih spojeva iz komine. Ekstrakcija uključuje nekoliko procesa kao što su difuzija otapala u stanice biljnog materijala, otapanje metabolita u otapalu, difuziju otapala s otopljenim tvarima izvan stanica te ispiranje. Čimbenici koji utječu na ekstrakciju su temperatura, veličina čestica, gibanje i vrsta otapala, dužina vremena ekstrakcije i pH-vrijednost (Rostagno i Prado, 2013).

2.4.1. Utjecaj otapala na proces ekstrakcije

U poželjna svojstva otapala za ekstrakciju ubrajaju se selektivnost otapala za spojeve koje se želi ekstrahirati, veliki ekstrakcijski kapacitet, nereaktivnost s biljnim materijalom, neškodljivost za ljude i opremu, potpuna hlapljivost i niska cijena.

Najčešće korištena otapala pri ekstrakciji fenolnih spojeva iz biljnog materijala su alkoholi (metanol, etanol i njihove vodene otopine), a zatim aceton i etil acetat.

Istraživajući utjecaj otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva iz vinske komine, pokožice i sjemenki grožđa Cheng i sur. (2006) su dokazali da se primjenom metanola kao otapala može ekstrahirati oko 20 % više fenolnih spojeva nego etanolom, dok su Lapornik i sur. (2005) dokazali da se primjenom alkoholnog otapala (etanola i metanola), iz ekstrakta dobivenog od komine grožđa, dobije pet puta više fenolnih spojeva nego korištenjem vode kao otapala.

Prilikom ekstrakcije suhog biljnog materijala bolji učinak se postiže s većim udjelom vodene faze u organskoj fazi (Robards, 2003). U industrijskim uvjetima za ekstrakciju fenolnih spojeva iz biljnog materijala više se koristi etanol ili vodene otopine etanola, zbog manje toksičnosti (Ignat i sur., 2011).

Za ekstrakciju fenolnih kiselina prisutnih u netopljivom obliku (vezane, esteri ili glikozidni kompleksi) osim primjene organskih otapala često se primjenjuje i kiselinska/ bazna hidroliza. Dodatkom baze, kiseline ili oboje dolazi do hidrolize i oslobađanja vezanih fenolnih kiselina, ali i do hidrolize nekih nestabilnih spojeva kao što su ostaci šećera ili acilnih skupina (Rostagno i Prado, 2013).

2.4.2. Utjecaj vremena i temperature na proces ekstrakcije

Na ekstrakcijski kapacitet izolacije fenolnih spojeva iz biljnog materijala značajan utjecaj imaju temperatura i vrijeme trajanja ekstrakcije.

Iako povećanje temperature pogoduje procesu ekstrakcije, jer dolazi do povećanja topljivosti spoja u otapalu te povećanja koeficijenta difuzije, fenolni spojevi podložni su hidrolizi i oksidaciji pri temperaturama višim od 60°C (Spigno i De Faveri, 2007). Stoga, predugo vrijeme trajanja ekstrakcije i visoka temperatura pospješuju oksidaciju fenolnih spojeva što dovodi do smanjenog udjela fenolnih spojeva u ekstraktu.

Provedenim istraživanjem (Lafka i suradnici, 2007) pokazalo se da povišenje temperature ekstrakcije iznad 60°C znatno smanjuje prinos ekstrahiranih fenola iz komine i taloga vina. Prema navedenom istraživanju ukupan sadržaj fenola se pri temperaturi od 80°C smanjuje za 10.3%, a pri 100°C za 15.7%.

Prema istraživanju koje su proveli Spigno i De Faveri (2007) određeno je kako pri ekstrakciji fenola iz komine grožđa nema značajne razlike između trajanja ekstrakcije 5 i 24 sata, dok je drugim istraživanjem Lapornika i suradnika (2005) ustanovljen porast prinosa kod ekstrakcije u trajanju od 12 do 24 sata pri sobnoj temperaturi.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJAL

U istraživanju je korištena liofilizirana komina grožđa sorte Merlot iz 2014. godine s područja Istre iz koje je pokožica odvojena od sjemena. Pokožica je korištena za istraživanja tj. ekstrakciju.

Parametri ekstrakcije su bili vrijeme trajanja i vrsta otapala i u dobivenim ekstraktima spektrofotometrijski su određivani:

- ukupni fenoli
- antocijani

Prilikom ekstrakcije korištena je 50 % vodena otopina etanola s tri različita udjela klorovodične kiseline (bez dodanog HCl, s 0,5 % HCl, te s 1% HCl). Također, ekstrakcija je provedena u različitim vremenskim intervalima (30, 45 i 60 minuta).

3.2. METODE RADA

3.2.1. Priprema ekstrakta

U ovom istraživanju ekstrakcija se provodila pomoću refluksa pri konstantnoj temperaturi od 80°C, a parametri čiji se utjecaj istraživao su dodatak kiseline, te vrijeme trajanja ekstrakcije. Plan pokusa prikazan je u Tablici 1.

Tablica 1. Plan za optimiranje ekstrakcije s 50%-tnom vodenom otopinom etanola obzirom na udio HCl-a i vremena trajanja ekstrakcije

Br. pokusa	Udio HCl-a (%)	Vrijeme (min)
1	0	30
2	0	45
3	0	60
4	0,5	30
5	0,5	45
6	0,5	60
7	1	30
8	1	45
9	1	60

Postupak ekstrakcije:

Izvaže se 0,3 g uzorka liofilizirane pokožice grožđa na analitičkoj vagi (± 0.0001 g) te se homogenizira s 20 mL otapala za ekstrakciju (50%-tni etanol) u tikvici sa šlifom okruglog dna volumena 100 mL. Homogena smjesa se ekstrahira uz povratno hladilo u vodenoj kupelji pri temperaturi od 80 °C uz dodatak HCl-a (0, 0.5 i 1 %) , tijekom 30, 45 i 60 minuta. Vrući ekstrakt se ohladi na sobnoj temperaturi te profiltrira u odmjernu tikvicu od 25 mL preko filter papira te se dobiveni ekstrakt nadopuni do oznake otapalom za ekstrakciju. Ekstrakt se potom prelije u plastičnu falcon kivetu i čuva na -18 °C do analize.

3.2.2. Određivanje ukupnih fenola

Materijali i metode

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
2. Staklene kivete
3. Tehnička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01\text{g}$)
4. Analitička vaga Kern ABT 220-4M
5. Pipete, volumena 1 mL, 2 mL, 5 mL, 10 mL i 25 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 25 mL i 1 L
7. Menzura, volumena 100 mL i 1 L
8. Staklene epruvete
9. Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

1. Folin-Ciocalteu reagens (F.C. reagens)
2. Otopina natrijeva karbonata (7,5 %-tna otopina)

Priprema: Odvage se 7,5 g anhidrida natrijeva karbonata u staklenoj čašici te se pomoću destilirane vode kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 100 mL te destiliranom vodom nadopuni do oznake.

3. Standard galne kiseline

Priprema: Odvage se 500 mg galne kiseline u plastičnoj ladici za vaganje te se pomoću 10 mL 96%-tnog etanola kvantitativno prenese i otopi u odmjernoj tikvici volumena 100 mL, koja se potom do oznake nadopuni destiliranom vodom.

Priprema uzorka

Ekstrakti pokožice grožda prije analize razrijeđeni su 10x.

Postupak određivanja

U staklenu epruvetu otpipetira se redom 2,5 mL F.C. reagensa (koji je 10x razrijeđen destiliranom vodom), 2 mL 7,5%-tnog natrijeva karbonata i 0,5 mL ekstrakta (koji je 10x razrijeđen otapalom). Sve se promiješa, a zatim se uzorci termostatiraju 15 minuta pri $T=45$

°C u vodenoj kupelji. Nakon termostatiranja mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm. Na isti način se pripremi i slijepa proba, ali se umjesto ekstrakta uzima otapalo za ekstrakciju

Izrada baždarnog pravca

Iz pripremljene otopine standarda galne kiseline rade se razrijeđenja u odmjernim tikvicama od 100 mL. Redom se otpipetira 1, 2, 3, 5 i 10 mL alikvota standardne otopine galne kiseline u svaku tikvicu nakon čega se tikvice pune destiliranom vodom do oznake. U tim tikvicama sada koncentracije galne kiseline iznose 50, 100, 150, 250 i 500 mg/L. Nakon toga se otpipetira po 0,1 mL otopine standarda iz svake tikvice u staklene epruvete, a potom se dodaje redom 0,2 mL F.C. reagensa (koji je razrijeđen 10x), 2 mL destilirane vode i 1 mL zasićene otopine natrijeva karbonata. Pripremljeni uzorci se termostatiraju pri $T=45\text{ }^{\circ}\text{C}$ vodenoj kupelji 25 minuta. Nakon termostatiranja mjeri se apsorbancija pri valnoj duljini 765 nm.

Iz izmjerenih vrijednosti apsorbancija nacrtava se baždarni pravac pomoću programa Microsoft Excel pri čemu su na apscisi nanosene koncentracije galne kiseline (mg/L), a na ordinati izmjerene vrijednosti apsorbancije pri 765 nm. Koncentracija ukupnih fenola izračunava se prema dobivenoj jednadžbi koja glasi:

$$Y = 0,0085 \times X$$

gdje je:

Y – apsorbancija pri 765 nm,

X – koncentracija galne kiseline (mg/L).

Izračunata X vrijednost izražena u mg/L ekstrakta se preračunava na mg/100 g komine uzevši u obzir odvagu, volumen ekstrakta i razrijeđenje.

3.2.3. Određivanje antocijana

Materijali i metode

Aparatura i pribor:

1. Spektrofotometar (UV UNICAM HELIOS β)
2. Staklene kivete
3. Analitička vaga Mettler (točnosti $\pm 0,01$ g)
4. pH metar Mettler Toledo Seven easy
5. Staklena čaša, volumena 1 L i 100 mL
6. Odmjerne tikvice, volumena 1 L i 10 mL
7. Mikropipeta, volumena 1000 μ L
8. Menzura, volumena 1 L
9. Plastična ladica za vaganje

Reagensi:

1. Kalijev kloridni pufer pH 1,0 (kalij klorid 0,025 M)

Priprema: U plastičnoj ladici za vaganje odvažuje se 1,86 g kalijeva klorida. Izvagani kalijev klorid se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1L gdje se otopi u deioniziranoj vodi. Čaša se nadopuni deioniziranom vodom do 1L. Nakon toga se pripremljenoj otopini izmjeri pH i podesi na vrijednost 1,0 ($\pm 0,05$) s HCl-om (37% HCl) čiji utrošak iznosi približno 6,3 mL. Kada se pH vrijednost otopine podesi na pH 1,0 pripremljena otopina se prebaci u bocu koja je prethodno dobro isprana deioniziranom vodom.

2. Natrijev acetatni pufer 4,5 (natrijev acetat, 0,4 M)

Priprema: U staklenoj čaši volumena 100 mL odvažuje se 54,43 g natrijeva acetata trihidrata ($\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) koji se kvantitativno prenese u staklenu čašu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te se doda 960 mL deionizirane vode i odvaga se otopi. Pripremljenoj otopini izmjeri se pH, i podesi na vrijednost 4,5 ($\pm 0,05$) s HCl-om (37 % HCl), čiji utrošak približno iznosi 20 mL. Kad je otopina podešena na pH

4,5 prebaci se u odmjernu tikvicu volumena 1 L, koja se prije upotrebe dobro ispere deioniziranom vodom, te do oznake nadopuni deioniziranom vodom.

Postupak određivanja

Reakcija se postavlja u epruvetama na način da se za mjerenje jednog uzorka pripreme dvije epruvete. U svaku se otpipetira po 0,5 mL pripremljenog ekstrakta (ili uzorka), a potom se u jednu epruvetu doda 2 mL pufera pH 1,0, a u drugu 2 mL pufera pH 4,5. Nakon 20 minuta, pripremljenim reakcijskim otopinama, mjeri se apsorbancija pri 520 nm i 700 nm. Kao slijepa proba korišteni su pufer pH 1 i pufer pH 4,5.

Izračunavanje

Koncentracija monomernih antocijana u uzorku izračunava se kao ekvivalent cijanidin-3-glukozida (mg/L) prema formuli:

$$\frac{A \times MW \times DF \times 10^3}{\varepsilon \times l}$$

gde je:

$$A = (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=1,0} - (A_{520\text{nm}} - A_{700\text{nm}})_{\text{pH}=4,5}$$

MW = molekulska masa (za cijanidin-3-glukozid 449,2 g/mol, za malvidin-3-glukozid 463.3 g/mol)

DF = faktor razrijeđenja

10^3 = faktor za preračunavanje g u mg

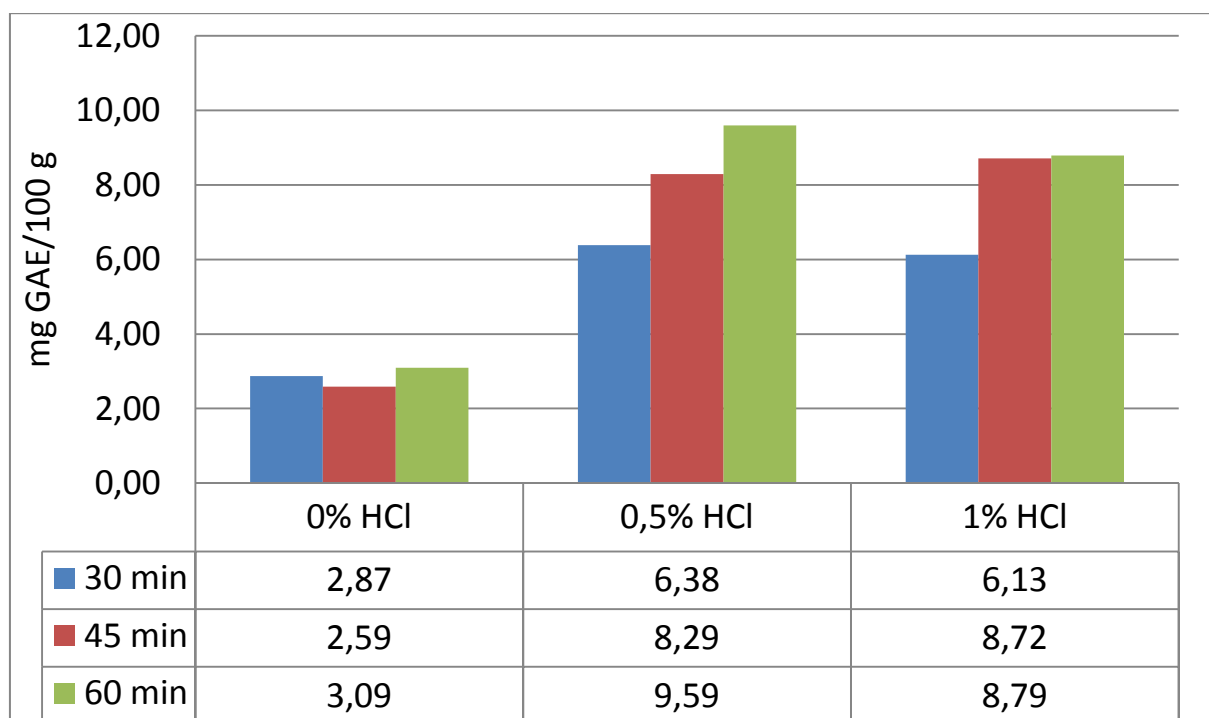
ε = molarni apsorpcijski ekstinkcijski koeficijent (za cijanidin-3-glukozid $26900 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, za malvidin-3-glukozid $28000 \text{ Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

l = debljina kivete (1 cm)

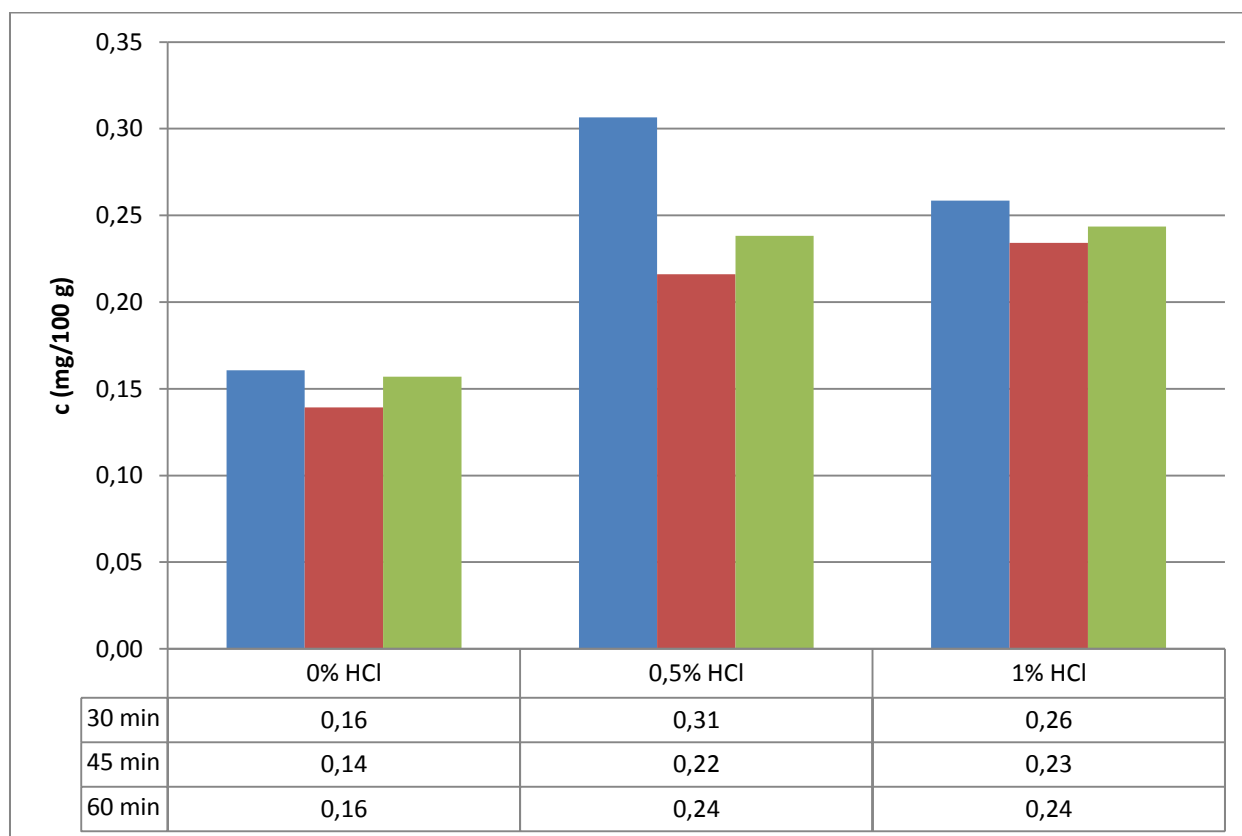
4. REZULTATI

U ovom radu istraživanja su provedena na uzorku pokožice izdvojene iz komine grožđa sorte Merlot. Prilikom istraživanja određivani su ukupni fenoli i antocijani spektrofotometrijski. Prilikom ekstrakcije korištena je 50% vodena otopina etanola s tri različita udjela HCl (bez dodanog HCl, s 0,5% HCl, te s 1% HCl). Također, ekstrakcija je provedena u različitim vremenskim intervalima (30, 45 i 60 minuta).

Tablica 2. Rezultati utjecaja odabranih parametara (udio HCl-a i vrijeme trajanja) na ekstrakciju ukupnih fenola



Tablica 3. Rezultati utjecaja odabranih parametara (udio HCl-a i vrijeme trajanja) na ekstrakciju antocijana



5. RASPRAVA

U ovom radu cilj je bio usporediti koncentracije ukupnih fenola i antocijana u jednom uzorku liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot. Ekstrakcija fenolnih spojeva i antocijana provedena je primjenom 50% vodene otopine s tri različita udjela HCl-a (bez dodanog HCl, s 0,5% HCl, te s 1% HCl) i različitim vremenom trajanja (30 min, 45 min i 60 min).

5.1. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju fenolnih spojeva

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 1. najbolja ekstrakcija fenolnih spojeva se postiže s 50%-tnom vodenom otopinom etanola uz dodatak 0,5% HCl-a. Kada se usporede ekstrakcije fenolnih spojeva iz komine 50%-tnom vodenom otopinom etanola i 50%-tnom vodenom otopinom etanola i 0,5% HCl-a vidljivo je da drugo otapalo daje gotovo tri puta veći prinos. Također, veći prinos u ekstrakciji fenolnih spojeva ima i vodeno otapalo 50%-tnog etanola uz 1% HCl-a od čistog otapala 50%-tnog etanola, ali nešto manji u odnosu na 50%-tno vodeno otapalo etanola uz 0,5% HCl.

5.2. Utjecaj trajanja postupka obrade na ekstrakciju fenolnih spojeva

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 1. najbolja ekstrakcija fenolnih spojeva postiže se s produljenjem trajanja ekstrakcije osim u slučaju sa 50%-tnim vodenim otapalom etanola bez dodanog HCl-a kada se ekstrakcija s produljenjem vremena trajanja neznatno mijenja.

Neki autori smatraju da je bolje provesti kraći period ekstrakcije, dok drugi smatraju da je učinkovitiji duži period ekstrakcije. Tako je prema istraživanjima Spigno i De Faveri (2007) zabilježeno kako pri ekstrakciji fenola iz komine grožđa nema značajne razlike između trajanja ekstrakcije 5 i 24 sata, dok je drugim istraživanjem (Lapornik i sur., 2005) ustanovljen porast prinosa kod ekstrakcije u trajanju od 12 do 24 sata pri sobnoj temperaturi.

5.3. Utjecaj vrste otapala i vremena trajanja na ekstrakciju fenolnih spojeva

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 1. pokazuje se kako se najveća vrijednost ekstrahiranih fenolnih spojeva u etanolnom ekstraktu s dodatkom 0,5% HCl-a postiže kroz vrijeme ekstrakcije od 60 minuta, što nije primjećeno u etanolnom ekstraktu jer vrijeme nema utjecaj na ekstrakciju u tom otapalu. U ekstraktu s etanolom i 1% HCl-a nema velike razlike u ekstrakciji prilikom trajanje obrade 45 i 60 minuta. Najmanja ekstrakcija fenolnih spojeva postignuta je u vremenu trajanja od 30 minuta.

5.4. Utjecaj vrste otapala na ekstrakciju antocijana

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 2. najbolju ekstrakciju antocijana pokazuje 50%-tno vodeno otapalo etanola i 0,5% HCl, potom 50%-tno vodeno otapalo etanola sa dodatkom 1% HCl-a. Najslabija ekstrakcija je pokazana u vodenom otapalo 50%-tnog etanola. 50%-tno vodeno otapalo etanola uz dodatak 0,5% HCl-a daje dva puta veći prinos u odnosu na 50%-tno vodeno etanolno otapalo.

Prema istraživanju (Revilla i sur., 1998.) u kojem su se za ekstrakciju antocijana iz pokožice grožđa koristile razne vrste otapala (80% metanol, 75% aceton, otopina metanola s 1% udjelom HCl-a) uvidjelo se da se najviše antocijana ekstrahiralo koristeći otapalo metanol s 1% udjelom HCl-a. Također su Bakker i Timberlake (1985) u svom istraživanju o ekstrakciji antocijana iz pokožice grožđa dokazali da se više antocijana ekstrahira koristeći metanol s 2% mravlje kiseline kao otapala za ekstrakciju.

Iz toga se može zaključiti da se dodatkom kiseline poboljšava ekstrakcija antocijana.

5.5. Utjecaj trajanja postupka obrade na ekstrakciju antocijana

Iz rezultata prikazanih u Tablici 2. vidljivo je da se najbolji rezultati postižu s najkraćim trajanjem ekstrakcije, tj. s trajanjem ekstrakcije 30 minuta. Produljenjem trajanja postupka obrade na 45 minuta ekstrakcija antocijana je nešto lošija. Međutim, ukoliko se ekstrakcija produlji na 60 minuta ekstrakcija antocijana ima veći prinos.

5.6. Utjecaj vrste otapala i trajanja postupka obrade na ekstrakciju antocijana

Prema rezultatima prikazanim u Tablici 2. pokazuje se kako se najveća vrijednost ekstrahiranih antocijana postiže s 50%-tnim vodenim otapalom etanola uz dodatak 0,5% HCl i u vremenu trajanja ekstrakcije od 30 minuta. Najmanja vrijednost ekstrahiranih antocijana se postiže s 50%-tnim vodenim otapalom etanola bez dodatka HCl-a i u vremenu trajanja obrade od 45 minuta.

5.7. Utjecaj vrste otapala i trajanja postupka obrade na ekstrakciju ukupnih fenola i antocijana

Prema dobivenim rezultatima može se zaključiti kako se najbolja ekstrakcija fenola i antocijana postiže etanolnim otapalom uz dodatak 0,5 % HCl-a i to za ukupne fenole u trajanju ekstrakcije 60 minuta, a za antocijane u trajanju ekstrakcije 30 minuta. Međutim, kako bi se dobili povoljni rezultati i za jednu i za drugu skupinu potrebno je koristiti etanolno otapalo uz dodatak 0,5% HCl-a i ekstrakciju provoditi 60 minuta.

Najmanji prinos se postiže etanolnim otapalom bez dodatka HCl-a i za jednu i za drugu skupinu bez obzira na vrijeme trajanja ekstrakcije.

Ekstrakcijom etanolnim otapalom uz dodatak 1% HCl-a postižu se veći prinosi nego čistim etanolnim otapalom, ali nešto manje nego etanolnim otapalom uz dodatak 0,5 % HCl-a.

6. ZAKLJUČAK

Na temelju provedenog istraživanja uvjeta ekstrakcije iz liofilizirane pokožice komine grožđa sorte Merlot može se zaključiti sljedeće:

1. Udio ukupnih fenola i antocijana je bio viši ukoliko je korišteno 50% vodeno otapalo etanola uz dodatak HCl-a, ali s različitim udjelom ovisno o vremenu trajanja ekstrakcije.
2. Udio od 0,5% HCl-a se pokazao dovoljnim, obzirom da s većim udjelom nije postignut i bitno veći prinos niti ukupnih fenola niti antocijana.
3. Udio ukupnih fenola raste s produljenjem trajanja ekstrakcije, dok se najbolja ekstrakcija antocijana postiže ukoliko je vrijeme trajanja ekstrakcije najkraće, odnosno 30 minuta.
4. Kako bi se postigao najveći prinos ukupnih fenola i antocijana potrebno je koristiti etanolnu otopinu uz dodatak 0,5% HCl-a te vrijeme trajanja ekstrakcije 60 minuta.

7. LITERATURA

Anderson, O. M., Jordheim, M. (2006.) The anthocyanins. U: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications (Anderson, O. M., Markham, K. R., ured.), CRC Press, Boca Raton, 472-551

Anonymus 1 (<http://vinopedia.hr/wiki/index.php?title=Hrvatska> ,posjeceno 21.4.2015.)

Anonymus 2 (http://cvetnadolina.com/vinske_sorte_vinove_loze.html, posjeceno 21.4.2015.)

Anonymus 3 (www.agroportal.hr ,posjeceno 21.4.2015.)

Bakker, J., Timberlake, C. F. (1985) The distribution of anthocyanins in grape skin extracts of Port wine cultivars as determined by high performance liquid chromatography. *J. Sci. Food Agr.* **36**, 1315-1324.

Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S. (2006.) Phenolic compounds in plants and agri-industrial by product: Antioxidant activity, occurrence and potential uses. *Food Chem.* **99**, 191-203

Bhattacharya, S. (2015) Conventional and Advanced Food Processing Technologies, John Wiley & Sons, Ltd, Oxford, 131.

Cheng, V. J., Bekhit, A. El-Din A., McConnell, M., Mros, S., Zhao, J. (2012) Effect of extraction solvent, waste fraction and grape variety on the antimicrobial and antioxidant activities of extracts from wine residue from cool climate. *Food Chem.* **134**, 474–482.

Clifford, M. N. (2000.) Anthocyanins-nature, occurrence and dietary burden. *J. Sci. Food Agr.* **80**, 1063-1072

Corrales, M., García, A.F., Butz, P., Tauscher, B. (2009) Extraction of anthocyanins from grape skins assisted by high hydrostatic pressure. *J. Food Eng.* **90**, 415–421.

El Gengaihi, S., Aboul Ella, F.M., Emad, M.H., Emad, S., Doha, H. (2014) Antioxidant Activity of Phenolic Compounds from Different Grape Wastes. *J Food Process Techn* **5**

Ignat, I., Volf, I., Popa, V.I. (2011) A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chem.* **126**, 1821-1835

Jackson, R. S. (2008) *Wine science*, 3. izd., Elsevier Academic Press, Amsterdam / Boston, str. 353-399.

Kammerer, D.R., Carle, R. (2008) Process Strategies for the Recovery and Isolation of Phenolic Compounds from Winery By-products. *Electron J Environ Agric Food Chem* **7(8)**, 3226-3230.

Kong, J. M., Chia, L. S., Goh, N. K., Chia, T. F., Brouillard, R. (2003.) Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, **64**, 923-933

Lafka, T.I., Sinanoglou, V., Lazos, E.S. (2007) On the extraction and antioxidant activity of phenolic compounds from winery wastes. *Food Chem.* **104**, 1206-1214.

Lapornik, B., Prosek, M., & Wondra, A. G. (2005) Comparison of extracts prepared from plant by-products using different solvents and extraction time. *J. Food Eng.* **71**, 214–222.

Milorad Zoričić, *Kultura vina*, 2009.

Rajha, H.N., Darra, N.E., Vorobiev, E., Louka, N., Maroun, R.G. (2013) An Environment Friendly, Low-Cost Extraction Process of Phenolic Compounds from Grape Byproducts. Optimization by Multi-Response Surface Methodology. *Food Nutrition Sci* **4**, 650-659.

Rice-Evans, Catherine, Miller, Nicholas, Paganga, George (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds, str. 152-159

Revilla, E., Ryan, J.M., Martin-Ortega, G. (1998) Comparison of Several Procedures Used for the Extraction of Anthocyanins from Red Grapes, *J. Agr. Food Chem.* **46**, 4592-4597

Robards, K. (2003) Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. *J. Chromatogr. A* **1000**, 657-691.

Rockenbach, I.I., Gonzaga, L.V., Rizelio, V.M., Schmidt Gonçalves, A.E. de S., Genovese, M.I., Fett, R. (2011) Phenolic compounds and antioxidant activity of seed and skin extracts of red grape (*Vitis vinifera* and *Vitis labrusca*) pomace from Brazilian winemaking. *Food Res. Int.* **44**, 897-901.

Rostagno, M.A., Prado, J.M., (2013) Natural Product Extraction - Principles and Applications. RSC, Cambridge, UK.

Shahidi, F., Naczk, M. (2004) *Phenolics in Food and Nutraceuticals*, CRC Press, London/New York/Washington D.C., str. 1-9; 146-152; 270-281.

Spigno, G., De Faveri, D.M. (2007) Antioxidants from grape stalks and marc: Influence of extraction procedure on yield, purity and antioxidant power of the extracts. *J. Food Eng.* **78**, 793–801.

Spigno, G., Tramelli, L., De Faveri, D.M. (2007) Effects of extraction time, temperature and solvent on concentration and antioxidant activity of grape marc phenolics. *J. Food Eng.* **81**, 200–208.

Teixeira, A., Eiras-Dias, J., Castellarin, S.D., Gerós, H. (2013) Berry Phenolics of Grapevine under Challenging Environments. *Int. J. Mol. Sci.* **14**, 18711-18739.

Tsao, R., McCallum, J. (2009.) Chemistry of Flavonoids. U: Fruit and Vegetable Phytochemicals: Chemistry, Nutritional Value and Stability (De la Rosa, L.A., Alvarez-Parrilla, E., Gonzalez-Aguilar, G., ured.), Blackwell Publishing, Ames, str. 131-153

Zhu, L., Zhang, Y., Lu, J. (2012) Phenolic contents and compositions in skins of red wine grape cultivars among various genetic backgrounds and originations, *Int. J. Mol. Sci.*, **13**, 3492-3510

Zobel, A.M. (1997.) *Phytochemistry of Fruits and Vegetables* (Tom-Barberan, F.A., Robinson, R.J., ured.), Clarendon Press, Oxford, UK, str.173-204.